

Comparación in vitro de la capacidad invasiva de dos formulaciones a base de *beauveria bassiana* como control biológico de *opsiphanes cassina*. Comparison in vitro of the invasive capacity of two formulations based on *beauveria bassiana* as a biological control of *opsiphanes cassina*.

Claudia Elizabeth Díaz-Castañeda
Universidad de Santander campus Cúcuta
cl.diaz@mail.udes.edu.co
Cielo Viviana Contreras-García
Universidad de Santander campus Cúcuta
cielovivi2@gmail.com
Diego Alejandro Gómez-Tinoco
Universidad de Santander campus Cúcuta
diegogomez1379@gmail.com

Recibido: 23 de abril de 2019.

Aprobado: 11 de junio de 2019.

Resumen—*Opsiphanes cassina* es la plaga defoliadora más común en las plantaciones comerciales de palma aceitera del país, siendo responsable de bajos rendimientos y de la desaparición de grandes cantidades de hectáreas de cultivo. El objetivo de este trabajo fue evaluar en laboratorio la capacidad invasiva de dos formulaciones (presentación en polvo y líquido) a base de *Beauveria bassiana* sobre el insecto *Opsiphanes cassina*. Las pruebas de control de calidad microbiológica mostraron porcentajes de germinación de esporas de *B. bassiana* para la formulación sólida del 90% mientras que en la líquida fueron del 97.7%. Se alcanzó un 100% de pureza para ambas formulaciones y la concentración de esporas fue de 4.9×10^{10} esporas/ml en la formulación sólida y en la líquida de 8.6×10^{10} esporas/ml. Concluyendo que la formulación líquida causa mayor mortalidad en un menor tiempo (6 días) sobre las larvas del III instar, siendo factible su producción y comercialización.

Palabras clave: *Beauveria bassiana*, control biológico, *opsiphanes cassina*, palma de aceite, capacidad invasiva.

Abstract—*Opsiphanes cassina* is the most common defoliating pest in the country's commercial oil palm plantations, being responsible for low yields and the disappearance of large numbers of hectares of cultivation. The objective of this work was to evaluate in laboratory the invasive capacity of two formulations (powder and liquid presentation) based on *Beauveria bassiana* on the insect *Opsiphanes cassina*. Microbiological quality control tests showed germination percentages of *B. bassiana* spores for the solid formulation of 90% while in the liquid they were 97.7%. 100% purity was achieved for both formulations and the concentration of spores was 4.9×10^{10} spores/ml in the solid formulation and 8.6×10^{10} spores/ml in the liquid formulation. Concluding that the liquid formulation causes greater mortality in a smaller time (6 days) on the larvae of the III instar, being feasible its production and commercialization.

Keywords: *Beauveria bassiana*, biological control, *opsiphanes cassina*, palm of oil, invasive capacity.

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: cl.diaz@mail.udes.edu.co (Claudia Elizabeth Díaz Castañeda).

La revisión por pares es responsabilidad de la Universidad de Santander.

Este es un artículo bajo la licencia CC BY-ND (<https://creativecommons.org/licenses/by-nd/4.0/>).

Forma de citar: C. E. Díaz-Castañeda, C. V. Contreras-García y D. A. Gómez-Tinoco, "Comparación in vitro de la capacidad invasiva de dos formulaciones a base de *beauveria bassiana* como control biológico de *opsiphanes cassina*", Aibi revista de investigación, administración e ingeniería, vol. 7, no. 2, pp.3-7, 2019.

I. INTRODUCCIÓN**II. METODOLOGÍA**

La palma de aceite es de gran interés en la agricultura y agroindustria debido a que participa en la producción de aceites, se aprovecha primordialmente para producir alimentos y productos de consumo humano. Es una planta adaptada a condiciones tropicales [1] y por su condición de cultivo introducido y permanente permite la estabilización del nuevo agroecosistema mediante un adecuado manejo de las plantas como eje central del sistema productivo y del entorno ecológico; la calidad de ese manejo depende en gran medida de los niveles de incidencia de insectos plaga nativos de importancia económica.

El cultivo de palma de aceite reviste gran importancia para Colombia dado que es uno de los principales productores de este rubro económico, no obstante, hacia el 2013 la Gobernación de Norte de Santander, Colombia, reportó para el municipio de Tibú 13.404 hectáreas de área sembrada de palma de aceite de las cuales se presentó un rendimiento para este año de 2.9 toneladas por cada hectárea de palma con una producción total al año de 38.842 toneladas y una pérdida de 10 hectáreas de cultivo representada en afecciones dadas por enfermedades que la atacan, donde sobresale la defoliación de la palma. Esta enfermedad causada por *Opsiphanes cassina*, afecta casi todas las zonas palmeras del país, en la mayoría de los casos es responsable de bajos rendimientos, debido a que causa defoliaciones severas en las palmas, produciendo así, la desaparición de grandes cantidades de hectáreas de cultivo.

El manejo de esta plaga se puede realizar mediante la captura de los adultos, reduciendo apreciablemente su población mediante el uso de cebos preparados con frutas maduras picadas las cuales son impregnadas con algún insecticida, aunque el uso indiscriminado de estos cebos puede ser negativo para los enemigos naturales [2]. Por otro lado, el uso de productos químicos tiene algunas desventajas, como es la toxicidad que afecta a la salud no solamente de los que se encargan de la fumigación sino de los que consumen los productos agropecuarios, ya que contienen materiales que son extraños al medio ambiente y en consecuencia pueden causar contaminación y polución al mismo [3].

De ahí que el control biológico se considere una estrategia de gran importancia ecológica y económicamente viable, ya que contribuye a la disminución del uso de productos insecticidas altamente tóxicos al medio ambiente [4]. Dentro de los plaguicidas microbianos se encuentran los hongos entomopatógenos considerados el método alternativo más efectivo con un gran potencial como agentes controladores, uno de los géneros de mayor importancia es *Beauveria bassiana*, este hongo afecta artrópodos, penetrando su cutícula, produciendo enfermedad y la muerte del insecto. Las formulaciones constan de combinaciones, de forma que las conidias se mantienen estables y efectivas. Sus colonias en agar papa dextrosa a los 14 días son algodonosas a pulverulentas y blancas, y a medida que pasa el tiempo se vuelven amarillentas, cremosas. Y en su revés son de color rojizo al centro y amarillento alrededor [5]. Posee la ventaja de ser un plaguicida biológico que no afecta organismos benéficos y no causa contaminación al medio ambiente. Su acción es por contacto y sus conidias actúan en los diferentes estadios del insecto plaga, logrando enfermar al insecto, lo cual ocasiona que deje de alimentarse y posteriormente muera [6].

En esta investigación se emplearon dos formulaciones una sólida y otra líquida a base de *B. bassiana*, y se describen los bioensayos realizados en laboratorio para determinar la capacidad invasiva de *B. bassiana* sobre el III instar larvario de *O. cassina* defoliador de la palma de aceite.

a. Material biológico

Para los ensayos se utilizaron larvas del III instar de *O. cassina* recolectadas en la Planta COOPAR municipio del Zulia, Norte de Santander, en donde se detectaron los focos de enfermedad por defoliación de la palma de aceite y una cepa de *B. bassiana* procedente de un cultivo original donado por el cepario de la Universidad Francisco de Paula Santander.

b. Aislamiento de *Beauveria bassiana*

El aislamiento de *B. bassiana* se realizó en Agar Papa Dextrosa (PDA) (MERCK) con 1µl Ampicilina, y se llevó a incubación durante 8 días a temperatura ambiente. Para el preinóculo se utilizó caldo extracto de levadura (extracto de levadura 5g/L más glucosa 10g/L).

c. Producción masiva del hongo

Para la formulación sólida se utilizaron botellas de vidrio, con 80 g de arroz más 80 ml de agua destilada y se llevaron a esterilización a 121°C con 15 lb, durante 15 minutos. Luego se procedió a inocular 8 ml del preinóculo en cada botella de vidrio y se dejaron durante 20 días en incubación a 25°C ± 2 hasta lograr un crecimiento uniforme. Para la formulación líquida se utilizó caldo extracto de levadura estéril, se inóculo el hongo *B. bassiana* y se dejó durante 8 a 15 días a temperatura ambiente hasta alcanzar una concentración de 1x10¹⁰ conidias/ml aproximadamente.

Luego se realizó el secado del producto a una temperatura no mayor de 28 °C, con humedad relativa (<70%), sin entrada de rayos solares. El material se mantuvo por 15 días, hasta que el contenido de humedad descendió al 12 ó 14%, según protocolo recomendado por Gómez y Mendoza [1] y se almacenó en refrigeración (4 a 8°C) hasta su utilización en los bioensayos. En el caso de la formulación líquida, se utilizó la matriz líquida, y para detener el proceso de esporulación se refrigeró (4 a 8°C) hasta su utilización en los bioensayos.

d. Pruebas microbiológicas de las formulaciones

Se realizaron pruebas microbiológicas como prueba de germinación o viabilidad para lograr establecer la capacidad invasiva de *B. bassiana*, y las pruebas de pureza y concentración de esporas para determinar calidad microbiológica de las dos formulaciones.

e. Prueba de germinación o viabilidad

Se estableció la viabilidad del hongo en combinación con el estimativo del número de esporas por gramo de arroz calculando la cantidad de esporas viables por unidad de peso o volumen. Esta prueba se realizó a partir de la dilución 10-3 en agar-agua al 3% inoculando 5µl, en 5 puntos del medio. Las cajas inoculadas se incubaron a 27°C por 7 días, transcurrido este tiempo, se extrajo el agar correspondiente a cada una de las alícuotas, y se colocó en láminas portaobjetos con azul de lactofenol. La observación se realizó al microscopio con el objetivo de 40x contando un mínimo de 100 esporas entre germinadas y no germinadas, por cada alícuota y se calculó el porcentaje de germinación.

f. Prueba de concentración de esporas

Se determinó el número de unidades infectivas por unidad de peso existentes en cada formulación. Se preparó la suspensión madre en un tubo de ensayo adicionando 1 gramo de arroz con el entomopatógeno *B. bassiana* y agua destilada estéril (ADE) con tween 80 al 0,1%, hasta completar 10 ml. Se tomaron cuatro submuestras de 1 ml y se depositaron en tubos con 9 ml de agua destilada estéril (ADE), quedando preparada la dilución 10-1 a partir de la cual se prepararon otras diluciones hasta 10-5. El recuento de esporas se llevó a cabo en

Comparación in vitro de la capacidad invasiva de dos formulaciones a base de *beauveria bassiana* como control biológico de *opsiphanes cassina* la cámara de Neubauer o hematocitómetro [2]. La concentración de esporas C se calculó multiplicando el promedio del número de esporas por cuadrante obtenido (N), por el inverso de la dilución empleada y el factor de la cámara. $C = N \times \text{inverso de la Dilución empleada} \times \text{Factor de la cámara}$ (5×10^4). Esta concentración se expresó en esporas/g (e/g). Este valor corresponde al estimado del número de esporas por gramo de arroz o esporas por mililitro.

$$C = \sum(A + B + C + D + E) * 50000 * FD = \frac{\# \text{esporas}}{\text{gramo de arroz}} \quad (1)$$

g. Prueba de pureza

Se realizó para establecer el porcentaje del agente biológico en la formulación tomada e identificar los contaminantes, ayudando a mejorar el proceso de producción del entomopatógeno. Se utilizó el medio Papa Dextrosa (PDA) más 1 µl de ampicilina. Luego de la agitación de los tubos de dilución en el vórtex, se tomaron 50 µl para inocular en cada caja, dispersando con asa de hockey, las cajas se incubaron a 27° C. Diariamente se contó el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de cada organismo durante 5 días. Al final de las lecturas, se registró el número de UFC de *B. Bassiana* y el número de UFC de otros microorganismos (hongos, bacterias y levaduras). Para el cálculo de pureza (P) se utilizó la siguiente fórmula.

$$\% P = \frac{\text{UFC del hongo deseado} \times 100}{\text{UFC totales}} \quad (2)$$

h. Prueba de patogenicidad: Bioensayos

Se seleccionaron las larvas teniendo en cuenta las características macroscópicas del instar III larvario de *O. cassina*, y se trasladaron al laboratorio en frascos de vidrio con capacidad de 3L a temperatura ambiente. Para el desarrollo del bioensayo se dispusieron 10 larvas por tratamiento por duplicado para un total de 60 larvas. A cada tratamiento se les suministró como alimento follaje fresco de la palma aceitera con una frecuencia interdiaria [3].

Para establecer la capacidad infectiva de *B. bassiana*, se realizó la aplicación de las formulaciones a cada uno de los tratamientos (grupo control (sin aplicación), formulación sólida, formulación líquida) a una concentración de 1010 esporas/ml mediante aspersión siguiendo

III. RESULTADOS, ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

Los resultados obtenidos en las pruebas de calidad de concentración de esporas, germinación de esporas y la prueba de viabilidad y pureza microbiológica de las formulaciones evaluadas utilizadas para la prueba de patogenicidad sobre *Opsiphanes cassina* se presentan en la tabla 1.

a. Capacidad invasiva in vitro de *B. bassiana* mediante ensayos de viabilidad del hongo

Según Shah [5] los hongos entomopatógenos como agentes de control biológico son vistos como agentes microbianos prometedores para el control de plagas de insectos y se están convirtiendo en una interesante alternativa al control químico, tal es el caso de *B. bassiana* que presentó un 90% de germinación o viabilidad en la formulación sólida, mientras, en la formulación líquida obtuvo un 97,7%. Estos resultados estuvieron por encima de los reportados por Posada et al., [6] quienes refieren porcentajes de germinación del 86,1%, lo cual indica que el porcentaje de germinación tanto en la formulación sólida como en la líquida, obtenido en esta investigación es adecuado, ya que de la germinación depende que las conidias absorban la humedad del medio para poder mantener la viabilidad del hongo. Dado lo anterior, se ratifica lo expresado por Góngora et al., [4] quienes afirman que las pruebas de calidad más importantes son la viabilidad y virulencia, ya que, si una formulación de esporas tiene alta viabilidad y virulencia, es mayor la probabilidad de que actúe bien en el campo para controlar al insecto. Por lo tanto, se demostró que las formulaciones a base de *B. bassiana* son capaces de causar la infección y la mortalidad al estado larvario de *O. cassina* evaluado en este trabajo.

Tabla 1. Pruebas de calidad de las formulaciones evaluadas

Formulación	Concentración de esporas esp/g	Germinación de esporas %	Pureza %	Viabilidad %	Observaciones
Líquida	8.6×10^{10}	97,7	100%	100%	Mortalidad transcurridos 6 días luego de la aplicación del producto
Sólida	4.9×10^{10}	90	99,5%	100%	Mortalidad transcurridos 8 días luego de la aplicación del producto

Fuente: elaboración propia.

b. Calidad microbiológica de las formulaciones evaluadas

Gómez y Mendoza [7], afirman que la prueba de pureza tiene como propósito establecer la proporción del agente biológico e identificar los contaminantes, ayudando a mejorar el proceso de producción del entomopatógeno. A nivel nacional, la resolución 000698 del 2011 [12], un producto entomopatógeno o bioinsumo de uso agrícola debe tener una pureza $\geq 95\%$ y no debe contener microorganismos contaminantes ni patógenos a humanos, plantas y animales. Por tanto, los resultados de esta investigación permitieron corroborar la pureza del hongo correspondiente al 100% en el producto líquido, y en el sólido al 99,5%; indicando que cualquiera de las dos formulaciones evaluadas se encuentra en condiciones adecuadas para la aplicación tanto a nivel de laboratorio como de campo.

Otra prueba para determinar la calidad del producto entomopatógeno es la concentración de esporas. Estudios realizados por Gómez y Mendoza [7], muestran que la concentración de esporas

adecuada es de 8×10^8 conidias/g arroz. De acuerdo a esto, se considera que la concentración de esporas del hongo *B. bassiana* en la formulación tanto sólida como líquida, correspondiente a un 4.9×10^{10} conidias/g arroz y 8.6×10^{10} conidias/ml respectivamente, cumplen con este criterio, lo que podría garantizar la muerte del insecto en pocos días como lo refieren Hajjar et al., [13], quienes con concentraciones más bajas de 1×10^8 esporas/ml, registraron la primera muerte después de 4 días de la aplicación directa.

Cabe resaltar, que en condiciones adecuadas de temperatura y humedad se pueden obtener concentraciones adecuadas de *B. bassiana* para ser utilizadas como control biológico. De acuerdo con Cenicafé, cuando se cultiva la cepa *B. bassiana* Bb9205 en arroz, bajo condiciones controladas en el laboratorio, se pueden obtener concentraciones hasta de 1×10^9 esporas/g de arroz [9].

c. Capacidad infectiva de *Beauveria bassiana* mediante bioensayos de patogenicidad.

Se demostró que las conidias de *B. bassiana* actúan principalmente por contacto, cuando el hongo es capaz de penetrar el insecto e invadirlo, provocándole la muerte por micosis. Según Téllez [7], la muerte puede ocurrir entre los 3 a 5 días. Dado lo anterior, en esta investigación se pudo confirmar una mayor mortalidad transcurridos 6 días luego de la aplicación del producto líquido correspondiente a un 100%, respecto al producto sólido quien registró una mortalidad del 100% a los 8 días de su aplicación, esto garantiza que el hongo entomopatógeno sea el causante de la mortalidad del insecto plaga, dado que las pruebas de patogenicidad de los productos comerciales deben causar mortalidades superiores al 80% [4].

Tabla 1. Pruebas de calidad de las formulaciones evaluadas

Día	FORMULACIÓN SÓLIDA				FORMULACIÓN LÍQUIDA				CONTROL		
	LV	%	LM	%	LV	%	LM	%	LV	%	LM
1	10	100	0	0	10	100	0	0	10	100	0
2	10	100	0	0	10	100	0	0	10	100	0
3	7	70	3	30	5	50	5	50	10	100	0
4	4	40	3	30	3	30	3	30	10	100	0
5	2	20	2	20	1	10	2	20	10	100	0
6	2	20	0	0	0	0	1	10	10	100	0
8	2	20	0	0	0	0	0	0	10	100	0
9	0	0	2	20	0	0	0	0	10	100	0

Fuente: elaboración propia.

LV: Larvas vivas LM: Larvas muertas

Según Zhang, L. et al., [8], la patogenicidad de *B. bassiana* Bb1801 en las larvas del escarabajo de trementina roja, *Dendroctonus valens*, mató al 100% de las larvas tratadas en un tiempo aproximado de 4,6 días a una concentración de 1×10^7 esporas/ml. En el presente estudio se observó la muerte de las larvas del III instar de *O. cassina* a partir de las 48 horas, la duración se debe a la relación que existe entre el tiempo y el contacto que ocurre entre las larvas y su infección directa o indirectamente por *B. bassiana*. Estudios realizados por Hajjar, M. et al., [9], mostraron la primera muerte causada por las concentraciones estudiadas a 1×10^8 , 1×10^7 y 1×10^6 esporas/ml de *B. bassiana* a los 4, 6 y 9 días después del tratamiento, respectivamente. Dado lo anterior, se encuentra una similitud entre los tiempos de mortalidad de las larvas de *O. cassina* y demás estudios en los cuales utilizan *B. bassiana* como control biológico de diferentes plagas. Cabe resaltar, que una temperatura y humedad adecuadas son importantes para mantener la viabilidad del hongo. Las evidencias anteriores se relacionan con los resultados obtenidos en este estudio en cámara húmeda observándose crecimiento sobre las larvas de 5 a 12 días, y se confirmó con la presencia de sus características microscópicas.

IV. CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los resultados de esta investigación, se puede concluir que la presentación líquida del producto a base de *Beauveria bassiana* mostró una mayor eficiencia dada principalmente por la mayor concentración de esporas del hongo, capacidad infectiva, patogenicidad en un menor tiempo y reducción en el tiempo de obtención del producto mostrando su factibilidad para una producción masiva y posible comercialización de este.

V. AGRADECIMIENTOS

Al Sr. Julio Omar Rivera Parada, al Técnico Ángel Yanes, y la Ing. Claudia Rodríguez de la planta COOPAR, por su colaboración en la recolección del instar larvario *O. cassina*

VI. REFERENCIAS

- [1] G. Rodríguez González, R. Silva Acuña, R. Cásares Moizant, R. Barrios Maestre, A. Díaz Quintana y J. Fariñas, «Aspectos bioecológicos del defoliador de la palma aceitera, *Opsiphanes cassina* Felder (Lepidoptera: Nymphalidae),» *Revista Científica UDO Agrícola*, vol. 12, n° 3, pp. 617-626, 2012.
- [2] INSTITUTO DE BIODIVERSIDAD Y ESTUDIOS AMBIENTALES, IBEA, BLUEFIELDS INDIAN AND CARIBBEAN UNIVERSITY (BICU), «Estudio de Caso: Proyecto Validación de Buenas Prácticas Agrícolas en el Cultivo de Palma Africana en Kukra Hill, RAAS, Nicaragua,» Nicaragua, 2011.
- [3] H. Calvache Guerrero, «Manejo integrado de plagas de la palma de aceite,» *Palmas*, vol. 16, n° Número especial, pp. 255-264, 1995.
- [4] E. Nava Pérez, C. García Gutiérrez, J. R. Camacho Báez y E. L. Vázquez Montoya, «Bioplaguicidas: Una opción para el control biológico de plagas,» *Ra Ximhai*, vol. 8, n° 3b, pp. 17-29, 2012.
- [5] V. Cañedo y T. Ames, Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos,, Lima: Centro Internacional de la Papa (CIP), 2004.
- [6] A. Téllez Jurado, M. G. Cruz Ramírez, Y. Mercado Flores, A. Asaff Torres y A. Arana Cuenca, «Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e

- [7] P. Gómez Pereira y J. Mendoza Mora, «Guía para la producción de *Metarhizium anisopliae*,» Centro de investigación de la caña de azúcar del Ecuador, Quito, 2004.
- [8] D. Pinto, G. Pauli, G. Moura y I. Delalibera, «A protocol for determination of conidial viability of the fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from commercial products,» *Journal of Microbiological Methods*, vol. 119, pp. 44-52, 2015.
- [9] C. Góngora, P. Marín y P. Benavides, «Claves para el éxito del hongo *Beauveria bassiana* como controlador biológico de la broca del café,» Federación Nacional de Cafeteros Cenicafe, Chinchiná, 2009.
- [10] P. Shah y J. Pell, «Entomopathogenic fungi as biological control agents,» *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 61, pp. 413-423, 2003.
- [11] F. Posada, D. Villalba y A. Bustillo, «Los insecticidas y el hongo *Beauveria bassiana* en el control de la broca del café,» *Cenicafe*, vol. 55, n° 2, pp. 136-149, 2004.
- [12] Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), «Resolución 000698: Requisitos para el registro de departamentos técnicos de ensayos de eficacia, productores e importadores de bioinsumos de uso agrícola y se dictan otras disposiciones,» ICA, Bogotá, 2011.
- [13] M. Hajjar, M. Ajlan y M. Al-Ahmand, «New Approach of *Beauveria bassiana* to Control the Red Palm Weevil (Coleoptera: Curculionidae) by Trapping Technique,» *Biblioteca Nacional de Medicina de los EE.UU*, vol. 108, n° 2, pp. 425-432, 2015.
- [14] L.-W. Zhang, Y.-J. Liu, J. Yao, B. Wang, B. Huang, Z. Li, M.-Z. Fan y J. Sun, «Evaluation of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) isolates as potential agents for control of *Dendroctonus valens*,» *Insect Science*, vol. 18, n° 2, pp. 209-216, 2010.